

图4 丹皮酚颗粒和丹皮酚原料的溶出试验结果

较快。

3 讨论

含有丹皮酚的片剂和胶囊等制剂常常因为丹皮酚的挥发性和不稳定性而影响成品的稳定性。本研究将干法制粒和颗粒包衣技术相结合制备了丹皮酚颗粒，丹皮酚的收率达到96.2%，质量分数达到45.8%；初步稳定性考察结果显示丹皮酚颗粒的稳定性明显优于丹皮酚混合粉末；溶出度考察结果显示丹皮酚颗粒中的丹皮酚溶出较快。表明本研究制备的丹皮酚颗粒不仅在制备过程中丹皮酚损失小，颗粒中丹皮酚含量高，辅料用量少，而且稳定性较好，丹皮酚溶出较快。

在研究过程中，分别采用了微晶纤维素、低黏度HPMC、预胶化淀粉与丹皮酚干法制粒，颗粒的成型性均较好，但微晶纤维素和预胶化淀粉制备的颗粒中丹皮酚溶出较慢，因此选择低黏度HPMC制备丹皮酚颗粒。在考察低黏度HPMC的用量时，发现颗粒中HPMC用量低于50%时，颗粒中细粉较多，不利于后面的颗粒包衣，因此选择颗粒中HPMC的用量为50%。为了将本研究的丹皮酚颗粒应用于含有丹皮酚的制剂中，丹皮酚颗粒的处方和制备工艺有待进一步优化。

参考文献:

- [1] 孙言才,沈玉先,孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. 中成药,2004,26(7): 579-582.
- [2] 杨正生,彭振辉,姚青海,等. 丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 中国药物与临床,2011,11(5): 230-233.
- [3] 李正荣,史浩,揭志刚. 丹皮酚对人结肠癌LoVo细胞增殖抑制机制的研究[J]. 消化肿瘤杂志,2010,2(4): 545-547.
- [4] 李英美,张彬,范晓惠. 白香丹胶囊中芍药苷、丹皮酚及 α -香附酮的HPLC含量测定[J]. 中成药,2009,31(11): 1690-1694.
- [5] 鲜洁晨,张宁,冯怡. 六味地黄丸质量差异分析[J]. 中成药,2009,31(6): 882-886.
- [6] 安骛,朱丽萍,王莹,等. 数字化色谱指纹谱技术在六味地黄丸药材鉴定中的应用[J]. 中成药,2010,32(1): 3-6.
- [7] 张杨,张振秋,王海波,等. 二妙丸多指标化学成分质量研究[J]. 中成药,2009,31(4): 562-566.
- [8] 廖正根,蒋且英,梁新丽,等. 桂枝茯苓胶囊中3种活性成分体外溶出度的比较研究[J]. 中成药,2008,30(8): 1141-1144.
- [9] 宋涛,吴亚军,赵越. 减压干燥和冷冻干燥对六味地黄生物制剂中丹皮酚和没食子酸含量的影响[J]. 中成药,2009,31(12): 1948-1950.
- [10] 王新成,雷钧涛,毕云峰,等. 穿蛭膏药材挥发油 β -环糊精包合物的制备研究[J]. 中成药,2011,33(5): 896-898.
- [11] 韩紫岩,王荔,张庆雷. 中药制剂中丹皮酚包合工艺的研究[J]. 河南大学学报:医学版,2007,26(3): 32-34.
- [12] 王正宽,王振中,徐连明,等. 胶体磨法包合丹皮酚及包合物稳定性考察[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2010,12(2): 307-310.

响应面法优化蚬壳花椒果皮多糖提取工艺

杨林, 邵文斌, 于爱红, 束长宇, 朱家君, 东建丽
(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 应用响应面分析法对蚬壳花椒果皮总多糖的提取工艺进行研究。方法 在单因素实验基础上选取实验因素与水平,根据中心组合(Box-Behnken)设计原理采用三因素三水平的响应面分析法,得到多元二次线性回归方程,以多糖提取率为响应值作响应面和等高线。结果 确定蚬壳花椒果皮总多糖的最佳提取工艺为:提取温度94℃、液料比82:1、提取时间146min、提取2次,在此条件下多糖提取率为4.99%。结论 多元回归分析结果显示,提取温度、液料比、提取时间与蚬壳花椒果皮多糖提取率之间的回归模型极显著,可用于实际生产预测。

关键词: 蚬壳花椒; 总多糖; 响应面分析

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-528(2012)09-1806-05

收稿日期: 2011-08-21

基金项目: 甘肃省自然科学基金计划(0916RJZA007); 大学生创新性实验计划(2010年)

作者简介: 杨林(1974—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:天然产物化学。Tel:(0931)2976703,13919277479,E-mail: yanglin-401@163.com

蚬壳花椒 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl., 又名单面针、山枇杷、大叶花椒、麻疯刺、九牛藤、公麒麟、蚌壳花椒等^[1], 属芸香科花椒属攀援藤本植物^[2], 在我国主要分布于甘肃、陕西、四川、贵州、广西、广东、湖南及湖北等省区^[4]。根、茎及叶均可入药, 有祛风活络、散瘀止痛、解毒消肿之功效, 民间用于治疗腰腿、关节疼痛、跌打损伤等症^[4]。传统中药主要以水煎剂入药, 蚬壳花椒中水溶性多糖可能是药物有效成分之一, 而多糖类化合物是一种免疫调节剂, 它能激活免疫受体, 提高机体的免疫功能, 在用于癌症的辅助治疗中, 具有毒副作用小、安全性高、抑瘤效果好等优点^[5]。

近年来, 对蚬壳花椒的研究报道较少, 王丽萍等^[6]、马英姿等^[7-12]、王平等^[13-14]及王海霞等^[15]对蚬壳花椒组织培养及生物学特性进行了一系列研究, 并发现蚬壳花椒资源日趋贫乏^[7]。汤俊等^[16]、韦瑀龙等^[17]从蚬壳花椒干燥茎中分别得到8个化合物和6个生物碱类化合物, 马英姿等^[18]从蚬壳花椒中性亲脂性成分中分离得到6个化合物并具有多种生物活性, 未见蚬壳花椒果皮多糖的相关报道。本实验应用响应面分析法对蚬壳花椒果皮总多糖提取工艺进行优化, 为蚬壳花椒果皮多糖的开发利用提供数据参考。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 药材 蚬壳花椒(采自甘肃省文县碧峰沟, 晾干, 粉碎)。

1.1.2 试剂 葡萄糖(分析纯, 天津市百世化工有限公司), 苯酚(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 浓硫酸(分析纯, 白银良友化学试剂有限公司), 石油醚(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 乙醇(分析纯, 天津市百世化工有限公司)。

1.1.3 仪器 AB-105N 电子天平(Mettler Toledo Group), 紫外分光光度计(Varian Australia RTY LTD); SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); DZF-6020 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 水提醇沉法提取蚬壳花椒总多糖工艺流程 原料粉碎→石油醚回流提取(100 mL/g)→过滤→滤渣→95%乙醇回流提取(100 mL/g)→过滤→烘干滤渣→热水浸提→离心→上清液→浓缩→seavage 法除蛋白→80%乙醇醇析→离心→干燥沉淀→粗多糖。

1.2.2 蚬壳花椒果皮多糖提取率的测定

1.2.2.1 标准溶液的制备 精密称取 105 °C 下干燥至恒质量的葡萄糖对照品 0.100 0 g 加蒸馏水溶解, 定容于 250 mL 量瓶中, 配成 0.4 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。精密吸取标准溶液 1、2、3、4、5 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 以蒸馏水定容, 得系列对照品溶液。

1.2.2.2 标准曲线的制备 精密吸取上述系列对照品溶液 1.0 mL, 分别置于 10 mL 比色管中, 将比色管置于冰水中, 分别向比色管加入 1 mL 苯酚试剂, 再加入浓硫酸 4 mL,

待各管加完后同时摇匀, 沸水加热 10 min, 冷却, 定容至刻度, 于 490 nm 测定吸光度值。另精密吸取蒸馏水 1.0 mL, 同法操作, 作为空白对照。以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $y = 2.767 6x + 0.006 9$ ($r = 0.999 4$), 线性范围为 0 ~ 0.2 mg/mL。

1.2.3 多糖提取率的测定 精密称取脱脂并干燥的蚬壳花椒果皮粉末 2.000 0 g 热水浸提, 过滤, 滤液定容至 500 mL 量瓶中, 得供试品溶液。用苯酚-硫酸法测定多糖含量, 精密吸取 1 mL 供试品溶液于 10 mL 比色管中, 按标准曲线的制备步骤操作, 测得的吸光度值代入标准曲线方程计算其浓度, 并得出多糖提取率。

1.2.4 单因素试验

1.2.4.1 提取温度对多糖提取率的影响 精密称取脱脂干燥蚬壳花椒果皮 2.000 0 g, 分别在温度为 60、70、80、90、100 °C, 液料比为 60 : 1 (mL/g) 的条件下提取 120 min, 提取两次, 过滤, 滤液冷却后, 每组实验重复 3 次, 下同, 按多糖提取率的测定方法计算总多糖提取率。

1.2.4.2 液料比对多糖提取率的影响 精密称取脱脂干燥蚬壳花椒果皮 2.000 0 g 根据提取温度筛选结果, 以最佳提取温度, 液料比分别为 20 : 1、40 : 1、60 : 1、80 : 1、100 : 1 的条件下提取 120 min, 提取两次, 过滤, 滤液冷却后, 按多糖提取率的测定方法计算总多糖提取率。

1.2.4.3 提取时间对多糖提取率的影响 精密称取脱脂干燥蚬壳花椒果皮 2.000 0 g 根据提取温度及液料比筛选结果, 分别以最佳提取温度及液料比条件下提取 60、90、120、150、180 min, 提取两次, 过滤, 滤液冷却后, 按多糖提取率的测定方法计算总多糖提取率。

1.2.4.4 提取次数对多糖提取率的影响 精密称取脱脂干燥蚬壳花椒果皮 2.000 0 g 根据提取温度、液料比及提取时间筛选结果, 以最佳提取温度、液料比及提取时间条件下分别提取 1、2、3、4 次, 过滤, 滤液冷却后, 按多糖提取率的测定方法计算总多糖提取率。

1.2.5 响应面分析法对提取工艺的优化 综合单因素试验结果, 根据 Box-benken 的中心组合设计原理^[19-20], 采用响应面法对蚬壳花椒果皮多糖的提取工艺进行优化。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度对多糖提取率的影响 试验数据表明, 多糖提取率随着提取温度的升高而增加, 至温度在 90 °C 时提取率最高, 之后提取率随着温度的升高而下降, 因此选择最佳提取温度为 90 °C, 见图 1。

2.1.2 液料比对多糖提取率的影响 试验数据表明, 多糖提取率随着液料比的增大而增加, 但在液料比 80 : 1 之后提取率有下降趋势, 因此, 选择液料比为 80 : 1, 见图 2。

2.1.3 提取时间对多糖提取率的影响 试验数据表明, 多糖提取率随着提取时间的增长有所增加, 在 150 min 之后趋于平缓。考虑到时间越长, 能耗越大, 因此, 选择最佳提取时间为 150 min, 见图 3。

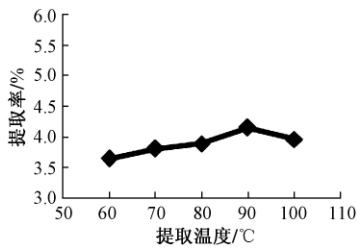


图1 提取温度对提取率的影响

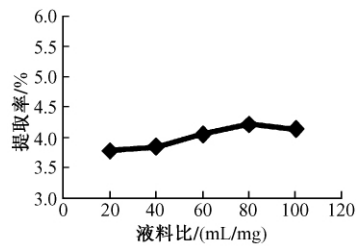


图2 液料比对提取率的影响

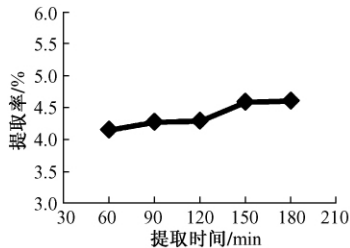


图3 提取时间对提取率的影响

2.1.4 提取次数对提取率的影响 试验数据表明,提取次数对提取率的影响比较小,提取两次后,提取率趋于平缓,考虑到提取次数越多,能耗也越大,因此,选择最佳提取次数为2次,见图4。

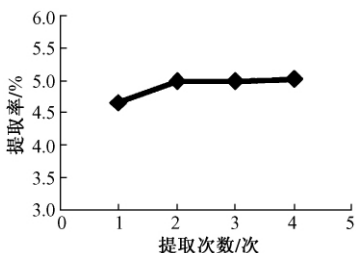


图4 提取次数对提取率的影响

由以上试验结果表明,蚬壳花椒果皮多糖各单因素最佳提取条件为:提取温度为90℃,液料比为80:1,提取时间为150min,提取2次。

2.2 采用响应面分析法对蚬壳花椒多糖提取工艺的优化 在单因素试验结果基础上,选择对提取率影响较为显著的提取温度(X_1)、液料比(X_2)、提取时间(X_3)3个因素做响应面分析,以 $X_1 = (Z_1 - 90) / 5$ 、 $X_2 = (Z_2 - 80) / 10$ 、 $X_3 = (Z_3 - 150) / 15$ 为自变量,以多糖提取率(Y)

为响应值,进行响应面分析试验,试验因素与水平设计见表1,具体试验方案及试验结果见表2。

表1 响应面分析因素与水平

水平	温度/°C	液料比/(mL·g ⁻¹)	时间/min
-1	85	70	135
0	90	80	150
1	95	90	165

表2 BOX-Behnken 试验设计及结果

实验序号	X_1	X_2	X_3	多糖提取率/%
1	-1	-1	0	4.34
2	-1	1	0	4.40
3	1	-1	0	4.46
4	1	1	0	4.57
5	0	-1	-1	4.53
6	0	-1	1	4.61
7	0	1	-1	4.79
8	0	1	1	4.65
9	-1	0	-1	4.44
10	1	0	-1	4.72
11	-1	0	1	4.45
12	1	0	1	4.60
13	0	0	0	5.03
14	0	0	0	4.99
15	0	0	0	5.00
16	0	0	0	4.99
17	0	0	0	4.98

表2中实验序号1~12为析因试验,实验序号13~17为中心试验。17个试验点分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点,零点为区域的中心点,零点试验重复5次,用以估计试验误差。采用Design-Expert软件对所得数据进行多元回归拟合,得到回归方程: $Y = 5.00 + 0.090X_1 + 0.057X_2 - 0.021X_3 + 0.011X_1X_2 - 0.032X_1X_3 - 0.056X_2X_3 - 0.33X_1^2 - 0.23X_2^2 - 0.12X_3^2$ 。

回归方程中 X_1 、 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 对蚬壳花椒果皮多糖提取率影响极显著, X_2X_3 对提取率影响高度显著,其他不显著,表明各实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。失拟项反映的是实验数据与模型不相符情况, F 检验结果不显著,因此模型选择正确。模型的 F 检验结果为极显著,复相关系数 $R^2 = 0.9933$,表明该回归方程模型拟合程度非常好。 $CV = 0.64\%$,数据较低,表明实验操作可信,以上回归分析表明可以用此模型来分析和预测蚬壳花椒果皮多糖最佳提取工艺条件。见表3,表4。

根据回归方程作响应面图,如图5~7。在描述任意两因素间的关系时,当固定其中一个因素不变,试验初期随另一因素的增大多糖提取率提高,但达到一定程度后多糖提取率反而降低,响应面规律与单因素试验基本一致。图5~7所示,温度和液料比对多糖提取率的影响均显著,变化幅度较大,提取时间的曲线较平缓,表明其对多糖提取率的影响较小。从等高线图可以看出,三个因素两两交互作用对多糖提取率影响大小,与方差分析结果一致。

表3 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	Pr > F	显著性
X_1	1	0.065	0.065	43.14	<0.0001	***
X_2	1	0.026	0.026	13.55	0.0009	***
X_3	1	3.570×10^{-3}	3.570×10^{-3}	4.64	0.0844	
X_1X_2	1	5.085×10^{-4}	5.085×10^{-4}	0.26	0.4729	
X_1X_3	1	4.160×10^{-3}	4.160×10^{-3}	0.11	0.0666	
X_2X_3	1	0.013	0.013	6.43	0.0070	**
X_1^2	1	0.45	0.45	246.79	<0.0001	***
X_2^2	1	0.23	0.23	103.99	<0.0001	***
X_3^2	1	0.065	0.065	40.34	<0.0001	***
模型	9	0.92	0.10	115.82	<0.0001	***
失拟项	3	4.979×10^{-3}	1.660×10^{-3}	5.50	0.0666	
纯误差	4	1.207×10^{-3}	3.018×10^{-4}			
所有项	16	0.93				

注: ***为极显著 ($P < 0.001$), **为高度显著 ($P < 0.01$), *为显著 ($P < 0.05$)。

表4 模型的可信度分析

平均值	4.62%
R^2	0.9933
R^2_{Adj}	0.9848
模型误差的平方根	0.030
Y 的变异系数 (CV)	0.64%

2.3 模型的验证 有响应面法分析可知,热水浸提蚬壳花椒果皮多糖的最佳工艺为:提取温度为 94.28 °C,液料比为 81.72 : 1,提取时间为 146.48 min,在此条件下的多糖提取率为 4.85%。为了验证响应面法的可靠性,采用上述最优提取条件进行蚬壳花椒果皮多糖的提取试验,同时考虑到实际情况,将提取工艺参数修正为:提取温度为

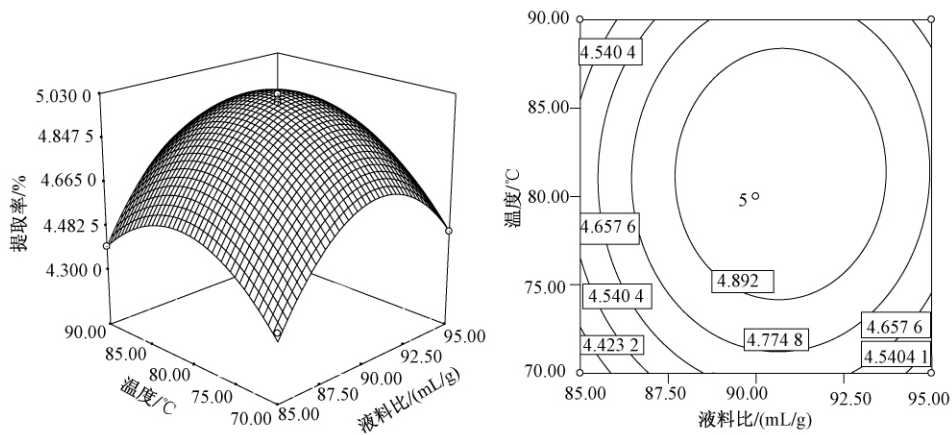


图5 提取温度 (X_1) 与液料比 (X_2) 对提取率 (Y) 的响应面与等值线

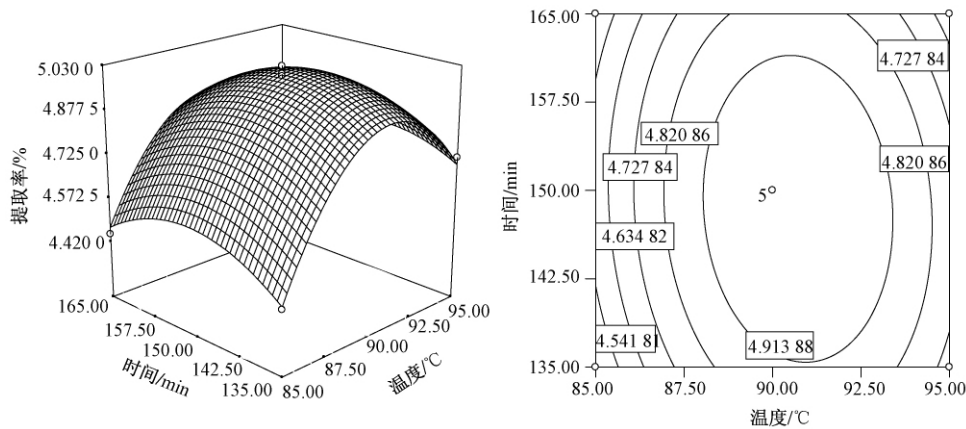


图6 提取温度 (X_1) 与提取时间 (X_3) 对提取率 (Y) 的响应面与等值线

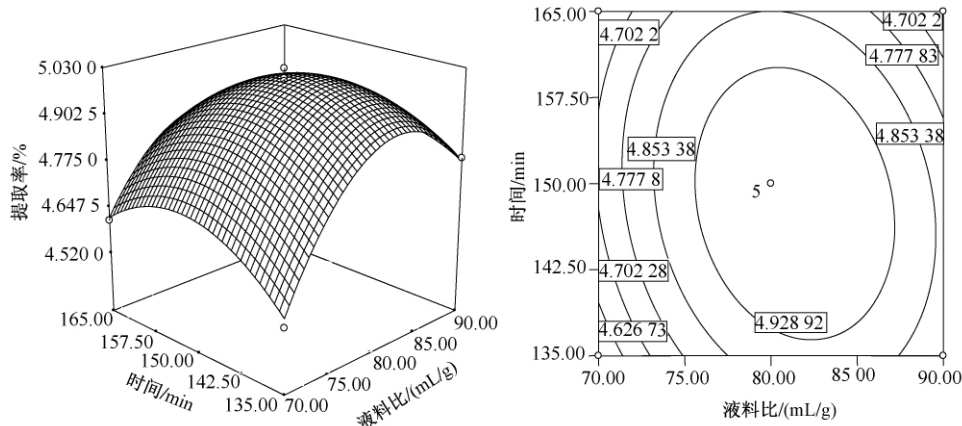


图7 液料比 (X_2) 与提取时间 (X_3) 对提取率 (Y) 的响应面与等值线

94 ℃, 液料比为 82 : 1, 提取时间为 146 min, 提取 2 次, 在此条件下做三组平行试验, 测得平均提取率为 4.99%, 与理论预测值相比, 其误差约为 2.87%, 在可接受范围内。

3 结论

采用水提醇沉法提取蚬壳花椒果皮总多糖, 利用实验设计软件 Design-Expert, 通过响应面法对多糖提取工艺进行优化研究, 使蚬壳花椒多糖的提取率最大化。经模型分析并修正后, 蚬壳花椒果皮多糖的最佳提取工艺为: 提取温度为 94 ℃, 液料比为 82 : 1, 提取时间为 146 min, 提取 2 次, 得出蚬壳花椒多糖平均提取率高达 4.99%。采用响应面法分析提取工艺, 不但可优化出最佳工艺, 而且可以对提取率进行预测, 其数据处理更加简便、科学。

参考文献:

[1] 南京中医药大学. 中华本草 (第4册 10-12卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 986-987.
[2] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册) [M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 183.
[3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 (下册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1586.
[4] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第43卷 第2册) [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 26-28.
[5] 王建, 龚兴国, 多糖的抗肿瘤及免疫调节研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(1): 52-54.
[6] 王丽萍, 王平, 王晓明, 等. 蚬壳花椒组培苗的生根试验 [J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 34-37.
[7] 马英姿, 王平, 梁文斌. 药用植物蚬壳花椒的生态及生物学特性调查 [J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 25-29.
[8] 马英姿, 王平, 王晓明, 等. 蚬壳花椒组培苗的增殖研究 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 552-555.

[9] 马英姿, 王平, 王海霞. 酸碱胁迫对蚬壳花椒组培苗内源激素的影响 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(5): 59-63.
[10] 马英姿, 王平, 王晓明, 等. 药用植物蚬壳花椒的离体培养及再生体系的建立 [J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2009, 32(1): 106-111.
[11] 马英姿, 杨波华, 王平. 药用植物蚬壳花椒种子休眠及萌发特性 [J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2009, 32(2): 98-102.
[12] 马英姿, 胡忠红, 杨波华, 等. 蚬壳花椒营养器官解剖结构及其生物碱分布 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 242-244.
[13] 王平, 王海霞, 马英姿, 等. 蚬壳花椒叶片不定芽诱导与内源激素的变化规律 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1400-1403.
[14] 王海霞, 王平, 王晓明, 等. 蚬壳花椒愈伤组织诱导的影响因素 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(2): 147-149.
[15] 王海霞, 王平. 蚬壳花椒组培苗移栽技术研究 [J]. 牡丹江师范学院学报: 自然科学版, 2010(2): 37-38.
[16] 汤俊, 朱卫, 屠治本. 蚬壳花椒化学成分的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(11): 563-565.
[17] 韦瑀龙, 张翠仙, 林朝展, 等. 蚬壳花椒中生物碱成分的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 471-474.
[18] 马英姿, 王平, 袁园, 等. 蚬壳花椒中性亲脂性成分的抑菌活性及其化学成分 [J]. 林业科学, 2010, 46(2): 162-165.
[19] Box G E P, Hunter W G. Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building [M]. New York: Wiley, 1990.
[20] 费荣昌. 试验设计与数据处理 [M]. 4版. 无锡: 江南大学出版社, 2001: 59-63.